

B24

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : 2 727 129  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 94 14187

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 1/16, 1/14, 15/52, C 12 Q 1/02

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 21.11.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 24.05.96 Bulletin 96/21.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE POULENC AGROCHIMIE —  
FR.

⑦2 Inventeur(s) : LEBRUN MICHEL, GROSJEAN  
COURNOYER MARIE CLAIRE et HOLLOMON  
DEREK W.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire :

⑤4 SYSTÈME DE CRIBLAGE PERMETTANT DE SÉLECTIONNER DES MOLECULES AYANT UNE ACTIVITE  
SPECIFIQUEMENT DIRIGEE CONTRE UNE CIBLE BIOCHIMIQUE DETERMINEE.

⑤7 1. Système de criblage permettant de sélectionner des  
molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre  
une cible biochimique déterminée.

2. Il comprend au moins deux microorganismes distincts,  
identiques du point de vue génétique à l'exception de l'acti-  
vité cible ou d'un homologue de cette activité:

. le premier pour tester l'expression de l'activité cible ca-  
pable de compléter un microorganisme ne présentant  
plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa  
croissance,

. le second pour tester l'expression d'une activité homo-  
logue à l'activité cible provenant d'un organisme quelcon-  
que et capable de compléter le même microorganisme  
ne présentant plus d'activité homologue endogène et per-  
mettre ainsi sa croissance.

FR 2 727 129 - A1



1

**Système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité  
spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée**

5        La présente invention a pour objet un système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée.

10        La nécessité d'obtenir des produits phytosanitaires à mode d'action parfaitement caractérisé rend de plus en plus indispensable l'utilisation de tests de criblages permettant de sélectionner les molécules issues de la synthèse sur la base d'un critère d'activité spécifique vis à vis d'une cible biochimique déterminée. De tels tests doivent de plus être adaptable à un criblage d'un très grand nombre de produits. Une des conditions serait d'automatiser l'utilisation de tels tests et par conséquent les paramètres mesurables du test doivent être simples à observer.

15        L'oïdium des céréales (*Erysiphe graminis*), des arbres fruitiers et de la vigne représente une maladie causant la destruction d'une part appréciable des récoltes. Cette maladie est contrôlée par différents produits à activité fongicide et, en particulier, de la famille des triazoles. La nécessité de produits alternatifs est évidente. Cependant, les moyens de criblage sur oïdium sont compliqués par la nature de parasite obligatoire de ce champignon. En effet, sa croissance est impossible en dehors de la présence de la plante hôte, ce qui exclue toute possibilité de test de criblage sur boîtes de Pétri et nécessite un criblage en serre relativement lourd à mettre en oeuvre.

20        La présente invention a pour but de répondre à ce besoin en proposant un système de criblage spécifique in vitro et adaptable au criblage d'un très grand nombre de produits. Elle concerne plus particulièrement un système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée, comprenant au moins deux microorganismes distincts, identiques du point de vue génétique à l'exception de l'activité cible ou d'un homologue de cette activité:

- 25        • le premier pour tester l'expression de l'activité cible capable de compléter un microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance,
- 30        • le second pour tester l'expression d'une activité homologue à l'activité cible provenant d'un organisme quelconque et capable de compléter le même microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance.

35        De préférence le système comprend 2 ou 3 microorganismes distincts.

Ces microorganismes peuvent être soit eukaryotes, soit prokaryotes.

Les microorganismes complémentés sont nouveaux et font également partie de l'invention. Ils sont caractérisés en ce qu'ils ne présentent plus, par mutation, d'activité

homologue de l'activité d'une cible déterminée et qu'il sont complémentés par expression de l'activité cible ou d'une activité homologue.

Les microorganismes sont rigoureusement identiques d'un point de vue génétique à l'exception de l'expression de l'activité cible ou d'un homologue de cette activité. L'inhibition différentielle potentielle de leur croissance ne peut résulter que de l'inhibition de l'activité qui les différencie. Une inhibition de la croissance des deux résulterait, soit de l'inhibition d'une activité commune, soit de l'inhibition par un même produit de l'activité qui les différencie. Par conséquent, l'observation de la croissance de ces deux types de microorganismes permet de cribler des molécules ayant une activité inhibitrice spécifique de la cible biochimique donnée.

Toute cible biochimique peut être utilisée afin de réaliser le système de criblage qui fait l'objet de la présente invention, qu'elle soit d'origine végétale, fongique, bactérienne, animale ou humaine. Cependant, afin de permettre une observation simple basée sur le critère de croissance, il est préféré que l'inhibition de l'activité de la cible biochimique soit létale pour la croissance du microorganisme, au moins dans un milieu de culture déterminé.

Par activité cible, on entend l'activité enzymatique présente dans l'organisme dont on veut assurer le contrôle par la découverte de produits.

Par activité homologue à l'activité cible, on entend l'activité enzymatique identique à celle contenue dans l'organisme cible, mais présente dans un autre organisme.

Par complémentation, on entend la capacité d'une activité enzymatique hétérologue, c'est à dire provenant d'une source différente de celle de l'organisme hôte utilisé pour l'exprimer, à permettre la restauration d'un comportement analogue ou très proche du comportement de l'organisme sauvage, c'est à dire non modifié, à un organisme hôte modifié, dont le comportement, par rapport à un type sauvage, est altéré par absence de cette activité.

L'acétylcoenzyme A carboxylase (ACoACase ou ACCase; EC 6.4.1.2) catalyse la carboxylation ATP-dépendante de l'acétyl-CoA pour produire du malonyl-CoA. Le malonyl-CoA produit par l'ACoACase est utilisé dans diverses réactions et voies métaboliques: en particulier elle représente l'étape limitante de la voie de biosynthèse des acides gras. Chez les organismes de type eukaryote, les trois activités composant l'activité ACoACase (biotin-carboxyl carrier protein, biotin carboxylase et carboxyltransferase) sont portées par un seul polypeptide multifonctionnel. La séquence codant pour les gènes ou ADNc de plusieurs ACoACase est connue et a été publiée. La taille de l'ADNc complet est de l'ordre de 7 kbp pour la partie codante. Cependant, à l'exception du gène codant pour l'ACoACase de levure (*acc1*), aucune des séquences publiées ne correspond à un équivalent complet d'un ADNc codant pour l'ACoACase. C'est à dire que la séquence a été obtenue à partir de clonage d'ADNc incomplets et chevauchant, mais la reconstitution ou l'obtention d'un ADNc complet et fonctionnel, car permettant la synthèse d'un polypeptide actif, n'a jamais été rapportée. Il a

été montré que l'inactivation par disruption génique du gène codant pour l'ACoACase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* était létale à l'état haploïde. Il est de plus bien connu que certaines isoformes de l'enzyme de plantes monocotylédones sont inhibées par des produits herbicides de la famille des aryloxyphenoxypropionates et des cyclohexanediones et que cette inhibition conduit à la destruction des plantes sensibles, confirmant ainsi le caractère létal de l'inactivation de l'ACoACase sensible à ces produits. L'invention a également pour objet la séquence du gène codant pour l'ACoACase d'*Erysiphe graminis*, qui est nouvelle.

L'invention a également pour objet un procédé pour cribler des molécules protectrices des plantes qui consiste à préparer les microorganismes tels que décrits ci-dessus. La mise en oeuvre du système de criblage tel que décrit dans la présente invention pour la sélection de molécules présentant une activité spécifique d'inhibition vis à vis d'une cible biochimique déterminée, et particulièrement de l'ACoACase d'oïdium, est réalisée de la façon suivante. Un ou l'autre des microorganismes mutants, *Neurospora* ou levure, décrits dans les exemples développés ci-dessous, est complété avec les ACoACases provenant de différentes sources: rat, oïdium par exemple. On obtient donc un microorganisme exprimant un type d'ACoACase et l'autre microorganisme exprimant l'autre type d'ACoACase. Ces deux microorganismes sont strictement identiques par ailleurs. Les deux microorganismes sont mis en présence du produit à tester et on observe l'inhibition éventuelle de la croissance, par exemple en culture dans un dispositif de microplaques. Si une inhibition de la croissance du microorganisme exprimant l'activité ACoACase d'oïdium est observée en même temps qu'une absence d'inhibition de croissance du microorganisme exprimant l'activité ACoACase, par exemple de rat, on peut alors conclure que ce produit a une action spécifique sur l'ACoACase d'oïdium. Une observation de ce type correspond bien au résultat attendu de la mise en oeuvre du système de criblage tel que décrit dans la présente invention.

Deux exemples sont présentés afin de donner un aperçu du champ d'application de la présente invention. Ces exemples ne sont pas restrictifs et n'épuisent évidemment pas toutes les possibilités d'utilisation d'un tel système de criblage par un homme de métier.

Seules les techniques non généralement accessibles ou peu répandues en utilisation de routine, comme par exemple la transformation de *Neurospora crassa* ou les techniques de mutagénèses spécifiques à ce champignon, ont été décrites de façon exhaustive. En ce qui concerne les techniques d'extraction, de manipulations enzymatiques, d'observation visuelle ou après marquage radioactif des acides nucléiques, elles sont décrites dans la plupart des manuels de référence. Les modifications enregistrées entre les différentes versions n'ont pas de conséquences qualitatives sur le résultat attendu. De même en ce qui concerne l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et, en particulier, les techniques de recombinaison homologue de l'ADN pour l'obtention de mutants. L'homme de l'art peut donc avec bénéfice

ch isir une ou un mélange de ces différentes méthodes. Les deux manuels de référence que nous avons utilisés pour les expériences décrites ci-dessous sont tout à fait généralement accessibles:

- o Current Protocols in Molecular Biology, 2 volumes (1994) Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. editors, John Wiley and Sons, Inc. Ce manuel de référence sera cité par la suite comme "CPMB".
- o Molecular cloning: a laboratory manual, 3 volumes (1989) Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. editors, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ce manuel de référence sera cité par la suite comme "Maniatis".

10

### Exemple 1

Dans ce premier exemple, une souche de levure diploïde disruptée dans une des copies du gène *acc1*, c'est à dire dont le gène *acc1* a été spécifiquement inactivé, a été complémentée par l'expression d'un ADNc d'ACoACase de rat. La sporulation des levures transformées a permis d'obtenir des levures haploïdes disruptées gardant leur capacité de croissance par expression de l'activité ACoACase de rat.

15

#### 1) Obtention d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* diploïde présentant une copie disruptée du gène *acc1*

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* YPH 501 utilisée pour ce travail a été obtenue auprès du fournisseur Stratagene, n° catalogue: 2174415. Cette souche présente le génotype suivant: *mat ala*, *ura3-52*, *lys2-801amber*, *ade2-101ochre*, *trp1-D63*, *his3-D200*, *leu2-D1*.

20

#### a- obtention du fragment disruptant

L'ADN de la souche YPH 501 a été extrait suivant le protocole décrit dans le "CPMB". Cent ng d'ADN génomique ont été utilisés pour amplifier un fragment de l'ACoACase de levure dont la séquence est décrite dans: Al-Feel W., Chirala S.S. and Wakil S.J. (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 89, 4534-4538. Cent cinquante ng de chacun des deux oligonucléotides suivants ont été utilisés sous un volume final de 50 µl, la position nucléotidique correspondant à la première base 5' par rapport à la séquence publiée est indiquée entre parenthèse à côté de l'extrémité 5':

30

oligo1: 5'(4800)-GACGAATTCCTCAATAAGG-3' (site EcoRI souligné)

oligo2: 5'(6188)-GATAATTGAGATCTCAATTC-3' (site BglII souligné)

Les conditions de la PCR sont celles décrites par le fournisseur Perkin-Elmer avec un appareil de type 9600. Les conditions de cycles utilisées sont: 5min./95°C-35x(30sec./95°C-30sec./50°C-1min.30sec./72°C)-5min./72°C. La taille du fragment amplifié est de environ 1,4 kpb.

35

Le fragment amplifié a été cloné par ligation dans un vecteur de clonage de produits PCR construit de la façon suivante. L'ADN du plasmide pBSISK- est digéré par l'enzyme de

restricti n EcoRV, puis traité par l'enzyme terminal transférase en présence de dideoxythymidine, dans les conditions décrites par le fournisseur (Boehringer). L'ADN du plasmide recombinant résultant de la ligation du produit PCR avec le vecteur préparé selon les conditions ci-dessus a été préparé en quantité puis digéré par les enzymes de restriction

5 MscI et EcoRV qui coupent toutes deux uniquement dans l'insert et éliminent un fragment de 0,7 kpb. Le fragment de haut poids moléculaire obtenu est séparé du fragment de 0,7 kpb par électrophorèse et purifié à partir du gel. Ce grand fragment est mis à liguer avec un fragment à extrémités franches de 1,1 kpb contenant le gène *ura3*. Ce fragment provient de la digestion

10 par les enzymes de restrictions EcoRI et HindIII du plasmide pYEUra3 commercialisé par Clontech sous la référence 6195-1, suivi d'un remplissage des extrémités cohésives par la polymérase de Klenow, puis d'une purification du fragment de 1,1 kpb contenant le gène *ura3* après électrophorèse en gel d'agarose. Un des plasmides obtenus obtenus a été préparé en masse, puis digéré par les enzymes de restrictions EcoRI et BglII. Le fragment de environ 1,8 kpb a été purifié après électrophorèse en gel d'agarose. Ce fragment linéaire contient:

15 environ 0,35 kpb du site EcoRI au début du gène *ura3* inséré, 1,1 kpb correspondant à l'insertion du gène *ura3*, environ 0,35 kpb de la fin du gène *ura3* inséré au site BglII. Ce fragment linéaire sera utilisé par la suite pour obtenir la disruption du gène *acc1* dans la levure. Il sera nommé par la suite : le fragment disruptant.

#### b- disruption de YPH501

20 Le protocole suivi est décrit dans le "CPMB". Un mg du fragment disruptant est électroporé dans les levures YPH501 électrocompétentes avec un BioRad pulser dans une cuvette de 0,2cm d'épaisseur, 200Ohms, 25 µFarads et 1500volts. Les levures sont étalées sur un milieu minimum (Yeast nitrogen base) contenant tous les acides aminés et bases pour lesquels la souche est auxotrophe (leucine, histidine, lysine, adenine, tryptophane) à

25 l'exception de l'uracile. Ce milieu contient 1M sorbitol comme osmoprotectant. Après 3 jours de croissance à 28°C, les colonies sont repiquées sur le même milieu sans sorbitol. Après 2 à 3 jours de croissance à 28°C, quelques colonies sontensemencées dans 10 ml du même milieu liquide et misent à pousser pour deux à trois jours, à 28°C et à 250 rpm sur une table agitante.

30 L'ADN chromosomique de ces colonies est extraits suivant le protocole décrit dans le "CPMB". Environ 1 mg d'ADN est digéré par les enzymes de restrictions EcoRI et BglII et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane Nytran (Schleicher et Schüll) en suivant les instructions du fournisseur. Cette membrane est hybridée à 65°C dans une solution contenant 0,25% lait écrémé; 6xSSC; 0,1% SDS avec le

35 fragment amplifié de 1,4 kpb rendu radioactif par "random-priming". La membrane est rincée à 65°C dans une solution de 0,5xSSC; 0,1% SDS, puis mise en fluorographie à -70°C avec un film RPXOmat et un écran renforceur QuantaIII. Après environ 4 heures de fluorographie, les clones disruptée dans une copie du gène *acc1* présentent un profil

d'hybridation de 2 bandes. Une bande à 1,4 kpb correspondant à l'hybridation du fragment EcoRI/BglIII dde la copie sauvage du gène *acc1* et une bande à 1,8 kpb correspondant au fragment EcoRI/BglIII ayant été délété du fragment MscI/EcoRV et ayant intégré à la place le gène *ura3*. La même hybridation réalisée sur de l'ADN extrait de la souche YPH 501 non transformée ne permet d'observer que la bande à 1,4 kpb.

Un des clones de levures présentant le profil ci-dessus a été mis en croissance dans le milieu de sporulation dans les conditions décrites dans le "CPMB". La dissection des spores a été réalisée avec un micromanipulateur de Fombrun. Les spores ont été misent à germer sur un milieu complet de levure YPD supplémenté par différents acides gras: acide myristique, acide oléique, acide stéarique et acide palmitique, chacun à 0,01%, dans 1% du détergent Brij58. Dans ces conditions, seules deux spores sont viables pour chaque asque contenant 4 spores. Les deux spores viables étant haploïdes et auxotrophes pour l'uracile. Cette dernière expérience permet de confirmer que la disruption du gène *acc1* est létale à l'état haploïde, répétant ainsi les travaux décrits par: Hasslacher M., Ivessa A.S., Paltauf F. and Kohlwein S.D. (1993) J.Biol.Chem., 268, 10946-10952. Cette souche diploïde YPH 501 présentant une copie disruptée du gène *acc1* a été nommée YPH 501 Dacc1, et sera utilisé par la suite comme souche récipiendaire pour la complémentation par les différentes activités ACoACase testées.

## 2) Obtention d'un clone d'ADNc complet de l'ACoACase de rat.

Les différentes expériences ont été réalisées à partir de la séquence de l'ACoACase de rat de 7038 pb a été publiée par: Lopez-Cazillas F., Bai D-H., Luo X., Kong I-S., Hermodson M.A. and Kim K-H. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 85, 5784-5788. Trois couples d'oligonucléotides ont été synthétisés pour permettre l'amplification par PCR de l'ensemble des fragments constituant l'ADNc complet de l'ACoACase de rat à partir d'ADNc simple brin de foie de rat disponible commercialement chez Clontech sous la référence: 7151-1. Les couples d'oligonucléotides ont été choisis de façon à permettre un remontage facilité de l'ADNc complet car présentant des sites de restrictions uniques.

La séquence des 3 couples d'oligonucléotides utilisés est la suivante, la position nucléotidique correspondant à la première base 5' par rapport à la séquence publiée est indiquée entre parenthèse à côté de l'extrémité 5':

1: 5'(1)-ACGTCTCGAGATGGATGAACCATCTCCGTTG-3' (le site XhoI, rajouté sur l'oligonucléotide et absent de la séquence de l'ACoACase de rat, est souligné. La séquence publiée commence au A juste derrière le site XhoI souligné)

1': 5'(2721)-GCCAGAGACACTGGTCATG-3'

2: 5'(2515)-CAGAGCACAGCTCTCCGAG-3'

2': 5'(4740)-GTCTTTGGTCACATACGGAG-3'

3: 5'(4518)-GGTCCTCCAGGCAGAACTG-3'

3': 5'(7038)-CTACGTAGAAGGGGAGTCC-3'

Les conditions utilisées pour l'amplification PCR étaient: 5 ml de Quick-clone cDNA de foie de rat de Clontech, 300ng de chacun des oligos des couples sous un volume de 100µl dans les conditions données par le fournisseur de la Taq DNA polymérase: Perkin-Elmer. Les conditions de cycles sur l'appareil Perkin-Elmer 9600 étaient: 5min/95°C-50x(30sec/95°C-30sec/55°C-3min/72°C)-5min/72°C.

Les produits d'amplification ont été clonés dans un vecteur pBSISK- selon les mêmes modalités que celles décrites ci-dessus pour le clonage du fragment disruptant. Sauf pour l'insert résultant de l'amplification par les oligonucléotides 1/1' qui a préalablement été digéré par XhoI et XbaI puis ligaturé avec le plasmide pBSISK- digéré par les mêmes enzymes.

Trois fragments clonés ont ainsi été obtenus correspondant à:

l'utilisation du couple d'oligonucléotides 1/1'	pRPA-ML-756
l'utilisation du couple d'oligonucléotides 2/2'	pRPA-ML-751
l'utilisation du couple d'oligonucléotides 3/3'	pRPA-ML-757

L'obtention d'un ADNc complet codant pour l'ACoACase de rat à partir de ces trois clones a été effectuée de la façon suivante:

- 1- l'insert ClaI/EcoNI du clone pRPA-ML-751 est ligaturé avec l'ADN du clone pRPA-ML-757 digéré par EcoNI/ClaI. Le clone résultant, nommé pRPA-ML-758, contient les deux fragments présents dans pRPA-ML-751 et pRPA-ML-757.
- 2- l'insert XbaI du clone pRPA-ML-758 est ligaturé avec l'ADN du clone pRPA-ML-756 digéré par XbaI. Un des clones résultant de l'orientation en sens requis de l'insert de pRPA-ML-758 dans pRPA-ML-756, nommé pRPA-ML-760, contient les trois fragments présents dans pRPA-ML-756, pRPA-ML-751 et pRPA-ML-757.

Ce plasmide final obtenu a été nommé pRPA-ML-760 et contient un insert de 7038 pb correspondant à l'ADNc complet de l'ACoACase de rat. Cet insert est utilisable pour transfert dans d'autres vecteurs après digestion par XhoI (coté 5'-ATG) et NotI ou EagI (coté 3'-stop).

### 3) Obtention de levure haploïdes disruptées dans le gène *acc1* et complémentées par le produit de l'expression de l'ADNc de l'ACoACase de rat

a- transfert de l'ADNc complet de l'ACoACase de rat dans un vecteur d'expression levure

Le vecteur d'expression dans la levure pYES2 commercialisé par la société Invitrogen sous la référence V825-20 a été utilisé comme vecteur de base. Une partie du gène *ura3* présent dans ce vecteur a été éliminé par coupure par les enzymes de restrictions ApaI et NheI. Le vecteur délété a été traité par la T4 DNA polymérase afin de rendre franches les extrémités des coupures.

Deux oligonucléotides de séquence, la position nucléotidique correspondant à la première base 5' par rapport à la séquence publiée est indiquée entre parenthèse à côté de l'extrémité 5',:



5'(208)-GTGAGCGCTAGGATCCACTGCCAGG-3'

5'(1434)-CGTTTACAATTTCCGGATCCGGTATTTTCTCC-3'

ont été utilisés pour amplifier le gène *his3* à partir du plasmide pRS413 commercialisé par la société Stratagene sous la référence: 217413. Le fragment a été amplifié par PCR dans les conditions suivantes: Appareil Perkin 9600; 50ng d'ADN du plasmide pRS413; 300ng de chacun des deux oligonucléotides sous un volume final de 100µl dans les conditions préconisées par Perkin-Elmer, fournisseur de la Taq polymérase; 5min/95°C-25x(30sec/95°C-30sec/55°C-1min30sec/72°C)-5min/72°C. Le fragment amplifié a ensuite été traité par la T4 DNA polymérase afin de rendre franches les extrémités. Le fragment *his3* et le vecteur pYES2 délété d'une partie du gène *ura3* ont été ligaturés. Le plasmide résultant, nommé pYES2/*his3*, confère aux levures présentant une mutation *his3* un phénotype d'autotrophie pour l'histidine.

Le plasmide pRPA-ML-760 a été digéré par l'enzyme de restriction *EagI*, puis traité par la polymérase de Klenow afin de rendre franche cette extrémité, et enfin digéré par l'enzyme *XhoI*. L'insert contenant l'ADNc complet de l'ACoACase de rat présentant le site *XhoI* à son extrémité 5' et le site *EagI* rempli à son extrémité 3' a été purifié. Le vecteur pYES2/*his3* a été digéré par l'enzyme *XbaI* puis traité par la polymérase de Klenow afin de rendre franche cette extrémité, et enfin coupé par *XhoI*. Le vecteur ainsi coupé a été ligaturé avec l'insert d'ACoACase de rat tel que préparé ci-dessus. Un clone obtenu contient l'ADNc complet de l'ACoACase de rat dans le vecteur pYES2/*his3* et a été nommé pRPA-ML-761. Ce plasmide a été utilisé par la suite pour toutes les expériences de transformation de levure et l'expression de l'ACoACase de rat dans les levures transformées.

b- transformation des levures YPH501Dacc1 et obtention de levures haploïdes disruptées

Le protocole suivi est décrit dans le "CPMB". Environ 100ng du plasmide pRPA-ML-761 sont électroporés dans les levures YPH501Dacc1 électrocompétentes avec un BioRad pulser dans une cuvette de 0,2cm d'épaisseur, 200Ohms, 25 pFarads et 1500 volts. Les levures sont étalées sur un milieu minimum contenant tous les acides aminés et bases pour lesquels la souche est auxotrophe (leucine, lysine, adenine, tryptophane) à l'exception de l'uracile et de l'histidine. Ce milieu contient 1M sorbitol comme osmoprotectant. Après 3 jours de croissance à 28°C, les colonies sont repiquées sur le même milieu sans sorbitol. Après 2 à 3 jours de croissance à 28°C, une colonie est repiquée sur milieu de sporulation. Les 4 spores issues d'un même asque sont microdisséquées avec un micromanipulateur de Fombrun et mise à germer sur un milieu complet YPD contenant 3% de galactose comme source carbonée.

Les 4 spores formées sont alors repiquées sur milieu minimum à 3% de galactose comme source carbonée contenant tous les acides aminés et bases pour lesquels la souche est auxotrophe (leucine, lysine, adenine, tryptophane) à l'exception de l'uracile et de l'histidine et

un milieu identique mais contenant de l'uracile. Deux des 4 spores poussent sur milieu sans histidine et sans uracile. Les deux autres spores nécessitent de l'uracile pour leur croissance. Les 2 spores poussant sur milieu sans uracile et histidine sont repiquées sur un milieu minimum identique mais contenant 2% de glucose comme source carbonée. Dans ces conditions, aucune croissance n'est observée. Par conséquent les levures haploïdes obtenues présentent bien une disruption du gène *acc1* par le gène *ura3* et d'autre part exprime une activité ACoACase, dépendante de la présence de l'inducteur galactose, capable de compléter l'activité endogène supprimée. Cette levure haploïde disruptée dans le gène *acc1* et complétée par le produit de l'expression de l'ADNc de l'ACoACase de rat a été nommé Yhap/rat. Cette souche de levure valide la faisabilité de l'objet de l'invention et est un des éléments à la base du test de criblage qui fait l'objet de la présente invention.

### Exemple 2

Dans ce second exemple, une souche mutante de *Neurospora crassa* déficiente dans l'expression de l'activité ACoACase endogène a été complétée fonctionnellement par l'expression d'un fragment d'ADN codant pour l'activité ACoACase d'oïdium.

#### 1) Isolement et caractérisation d'un gène d'ACCCase d'*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*

##### a- souche fongique

La souche *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (désigné ci-après Egh) 23D5 (Hollomon *et al.*, 1984 Proceeding of the British Crop Protection Conference - Pests and Disease, 477-482) est maintenue sur orge (variété Halcyon) en microcosme de 20 plantes. Les plants d'orge de 7 jours sont infectés par la souche 23D5 en secouant des feuilles de plantes infectées dans le microcosme. Les spores d'Egh 23D5 sont récupérées par aspiration 10 jours après l'infection.

##### b- extraction d'ADN d'Egh

Cinq cents mg de spores d'Egh sont broyés dans un mortier avec 500 mg de billes de verre (Sigma Chemical Co.). Le broyat est repris dans 4 ml de tampon d'extraction (200mM Tris-HCl pH8; 25 mM EDTA; 250 mM NaCl, 0,5% SDS; 14 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). Le mélange est chauffé à 65°C pendant 1 heure. 1 ml d'acétate de potassium (4M, pH 5,5) est ajouté et le mélange est mis à 4°C pendant 2 heures. Après une centrifugation de 1 heure à 4°C à 12000 x g, le surnageant est récupéré. L'ADN est alors précipité en présence de 2 volumes d'éthanol à -20°C pendant 1 heure. Après une centrifugation de 1 heure à 4°C à 12000 x g, l'ADN est repris dans 2 ml de TE 7,5 (10 mM Tris-base, 1mM EDTA, pH ajusté à 7.5 avec HCl concentré). Une extraction au phénol/chloroforme (1/1) est effectuée et l'ADN est alors précipité de nouveau par 2 volumes d'éthanol en présence de 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH 4,8). Le culot d'ADN est lavé avec de l'éthanol à 70%. L'ADN est repris dans 300  $\mu$ l de TE 7,5 et purifié sur un gradient de chlorure de sodium. Les fractions contenant l'ADN propre et non dégradé sont alors conservées à -20°C.

##### c clonage de l'ADN d'Egh dans le phage lambda EMBL3

L'ADN d'Egh est digéré de façon partielle par l'enzyme de restriction *Sau3AI*. L'ADN partiellement digéré dont la taille est comprise entre 9 et 23 kb est sélectionné par passage sur un gradient de chlorure de sodium. L'ADN obtenu est cloné entre les sites *BamHI* du phage lambda EMBL3 (Stratagene). L'ADN phagique est alors empaqueté in vitro en utilisant le kit "Gigapack II Gold Packaging Extract" (Stratagene) en utilisant les conditions recommandées par le fabricant et est ensuite utilisé pour infecter *E. coli* P2392. Le titre de la banque de gènes obtenue est de  $10^5$  pfu/ml. Après amplification, le titre de la banque de gènes a été porté à  $5.10^8$  pfu/ml.

d- préparation de la sonde de la région transcarboxylase de l'ACCCase de levure.

Deux amorces oligonucléotidiques #109 ( $5'$ GACGAATTCTTCAATAAGG $3'$ ) correspondant aux nucléotides 4800-4819 de la séquence de *Saccharomyces cerevisiae* (Al-Feel *et al.*, 1992, Proc. Natl Acad Sci. USA, 89:4534-4538) et #110 ( $5'$ GATAATTGAGATCTCAATTC $3'$ ) correspondant aux nucléotides 6168-6188 ont été synthétisées. Ces amorces ont été utilisées pour amplifier l'ADN de *S. cerevisiae* DH4 (Mullis and Faloona, 1987, Methods Enzymol., 155:335-350). La réaction d'amplification est effectuée dans un volume réactionnel contenant 100 ng d'ADN, 10 mM Tris-HCl pH9, 50mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X100, 0,2 mg/ml BSA, 0,1  $\mu$ M des amorces oligonucléotidiques #109 et 110, 200  $\mu$ M de chacun des quatre désoxynucléotides dATP, dCTP, dTTP, dGTP. Différents cycles sont effectués sur un thermocycleur (Autogene II - Grant Instruments (Cambridge) Ltd). Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 min, 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 1 min, d'hybridation à 50°C pendant 1 min et de synthèse à 72°C pendant 1 min sont effectués. Le mélange réactionnel est ensuite laissé à 72°C pendant 3 min pour une extension finale. L'ADN amplifié est visualisé sur gel d'agarose (1,2%) après coloration au bromure d'éthidium.

e- préparation de la sonde de la région transcarboxylase de l'ACCCase d'Egh.

L'ADN d'Egh a été digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* (Appligene - France) et mis à migrer sur un gel d'agarose (0,8% agarose dans tampon TBE (0.45 M Tris-Borate; 0,01 M EDTA)). L'ADN a été transféré sur une membrane de nylon (Amersham) en utilisant le système de transfert LKB 2016 Vacugene (Pharmacia LKB Biotechnology) et en suivant le protocole préconisé par le fabricant.

La membrane a été préhybridée à 42 °C dans une solution de SSC 5X, Denhardtts 5X, 30% formamide, 0,1% SDS (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd Edition) pendant 3 heures. La sonde marquée correspondant à la partie transcarboxylase de l'ACCCase de *S. cerevisiae* est alors ajoutée à la solution de préhybridation et l'hybridation est effectuée à 42 °C pendant 16 heures. La membrane est lavée à 50°C pendant 30 min dans une solution de SCC 2x, 0,1% SDS et deux fois 15 min dans une solution SCC 2X. Le signal d'hybridation est révélé sur un autoradiogramme.

L'ADN d'Egh présentant une homologie avec la sonde de la région transcaboxylase de la levure a été cloné dans le plasmide pUC18 (Messing, 1983, *Methods Enzymol.*, 101:20) digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*. Le plasmide a été utilisé pour transformer *E. coli* DH5a.

5 f- marquage des sondes

Les sondes sont marquées radioactivement au  $^{32}\text{P}$  en utilisant le "Random Primed DNA Labelling Kit" et en suivant les recommandations du fabricant (Boehringer Mannheim Biochemica).

g- criblage de la banque de gène - Préparation des membranes.

- 10 Cinquante ml de milieu TB (5g/l NaCl, 10 g/l Tryptone) contenant 1 ml d'une solution de maltose 10% et 0,5 ml d'une solution de 1M  $\text{MgSO}_4$  sont inoculés avec *E. coli* P2392. Après une incubation à 37°C sous agitation, les cellules sont centrifugées et reprises dans 10 mM  $\text{MgSO}_4$  afin d'avoir une densité optique à 600 nm de 0,5. 50 µl de la banque génomique diluée dans du tampon SM (5.8g/l NaCl, 3,6 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mM Tris-HCl
- 15 pH 7,5, 0,01% (p/v) gélatine) afin d'avoir 15 plages de lyse par  $\text{cm}^2$  sont ajoutés à 200 µl de cellules bactériennes. Les phages sont absorbés sur les cellules pendant 20 min à 37°C. Ce mélange est alors ajouté à 3 ml de "Top Agar" (Milieu NZ - Gibco BRL 16 g/l, 7 g/l agar) et est étalé sur milieu gélosé (16 g/l milieu NZ - Gibco BRL, 10 g/l agar) en boîte de Petri (diamètre 9 cm). Les boîtes sont alors laissées à 37°C pendant environ 6 heures jusqu'à
- 20 apparition des plages de lyse. L'ADN phagique est alors transféré sur membrane de nylon (Amersham) en suivant le protocole préconisé par le fabricant.

h- criblage de la banque de gènes

- Les membranes sont préhybridées à 42 °C dans une solution de SSC 5X, Denhardt's 5X, 30% formamide, 0,1% SDS (Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning*, A laboratory
- 25 manual, 2nd Edition) pendant 3 heures. La sonde marquée est alors ajoutée à la solution de préhybridation et l'hybridation est effectuée à 42 °C pendant 16 heures. Les membranes sont lavées à 50°C pendant 30 min dans une solution de SCC 2X, 0,1% SDS et pendant deux fois 15 min dans une solution SCC 2X. Les signaux d'hybridation sont révélés sur un autoradiogramme.

- 30 Les plages de lyse donnant un signal d'hybridation sont isolées et le phage est élué dans 1 ml de tampon SM à 4°C. Le phage peut être utilisé pour infecter des cellules bactériennes.

i- extraction de l'ADN phagique

- Les phages sont récupérés à partir de plage de lyse par élution avec 5 ml de tampon
- 35 SM par boîte de Petri pendant 2 heures sous agitation à température ambiante. Le milieu SM est ensuite centrifugé à 8000g pendant 10 min à 4°C pour supprimer les débris cellulaires. RNase A et DNase I sont alors ajoutées à une concentration de 1 µg/ml au surnageant et le mélange est incubé pendant 30 min à 37 °C. Puis un volume d'une solution contenant 20%

(p/v) de polyéthylène glycol et 2M de NaCl dans le tampon SM est ajouté et le mélange est incubé 1 heure à 0°C. Les particules phagiques sont alors récupérées par centrifugation à 10000g pendant 20 min à 4°C. Les particules phagiques sont alors reprises dans 0.5 ml de SM. Après centrifugation à 8000g pendant 10 min à 4°C, 5 µl de SDS 10% et 5µl de 0,5 M EDTA pH8 sont ajoutés au surnageant. Le mélange est incubé à 68°C pendant 15min. Deux extractions au phénol/chloroforme (1/1) et une extraction au chloroforme sont alors effectuées. L'ADN est alors précipité par un volume d'isopropanol. Le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70% et repris dans 50µl de TE8 et conservé à -20°C.

j- séquençage de l'ADN.

10 L'ADN a été séquençé par la méthode enzymatique de Sanger *et al.* (1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47:5463-5467). Le séquençage du gène de l'ACCCase a été effectué dans le laboratoire du Dr. L. Hall à l'Université de Bristol (Bristol - Angleterre) en utilisant un séquenceur automatique (Du Pont Genesis<sup>TM</sup> 2000 DNA analysis system). Le séquençage a été effectué sur les deux brins.

15 k- Résultat du clonage du gène ACCCase d'Egh

Le clonage de l'ADN d'Egh digéré par *EcoRI* présentant une homologie par hybridation avec la partie transcarboxylase de l'ACCCase de levure a permis d'isoler un clone contenant un fragment d'ADN de 3,16 kb. Ce clone pMC1 a été séquençé et a montré une forte homologie (64%) avec l'ACCCase de levure. Ce fragment a été utilisé pour cribler la banque d'ADN génomique d'Egh.

20 Un premier criblage de la banque a permis d'isoler le clone p19.1. p19.1 a été digéré par l'enzyme de restriction *SalI* (ce qui permet de séparer l'insert de l'ADN phagique) et a été sous cloné dans le plasmide pUC9 digéré par *SalI*. Un clone p19.1-6 contenant un insert d'environ 8 kb et présentant l'homologie avec pMC1 a été isolé. Le séquençage des extrémités de l'insert contenu dans p19.1-6 a montré que ce clone ne contenait pas le gène d'ACCCase d'Egh en entier. L'extrémité 5' de l'insert p19.1-6 correspondant au fragment *SalI*-*XbaI* (0,7 kb) a donc été utilisée comme sonde pour cribler une deuxième fois la banque d'ADN génomique d'Egh. Un clone différent de p19.1, p18.1, a été isolé et le sous-clonage dans pUC9 après digestion par *SalI* a permis d'isoler le clone p18.1-6 présentant l'homologie avec la sonde correspondant à l'extrémité 5' de p19.1-6. L'insert contenu dans p18.1-6 est de 13,5 kb. L'analyse des sites de restriction et le séquençage des extrémités 3' et 5' de ce clone a montré que p18.1-6 avait la même extrémité 3' que le clone p19.1-6 mais possédait environ 5 kb de plus en son extrémité 5'. Le clone p18.1-6 contient le gène de l'ACCCase d'Egh en entier ainsi qu'environ 3,5 kb en amont du gène et 3 kb en aval du gène. La séquence SEQ.ID 1 de 8123 pb contient 1070 pb de région promotrice ainsi que 80 pb de région 3' du gène de l'ACCCase d'*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*.

Le gène de l'ACCCase d'Egh est de 6973 bp. Trois introns putatifs ont été localisés dans la séquence. Ces trois introns sont respectivement de 54, 50, et 47 nucléotides. La

séquence d'acides aminés déduites de la séquence d'acides nucléiques (2274 aa) présente 63% d'identité (77% de similarité) avec la séquence de la levure, 47% d'identité (67% de similarité) avec les séquences de rat (Lopez-Casillas *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5784-5788) et de poulet (Takai *et al.*, 1988, J. Biol. Chem. 263: 2651-2657).

## 5 2) Obtention de mutants ACCase de *Neurospora crassa*.

### a- souches de *Neurospora crassa*

Deux souches de "mating type" opposé portant la mutation am132 (délétion du gène de la NADP-specific glutamate dehydrogenase (Kinnaird *et al.*, 1982, Gene, 20:387-396)) ont été utilisées. Am132A et Am132a sont cultivées sur milieu Vogel 1X, Sucrose 2%, acide glutamique 0,1%, agar 15g/l à 30°C.

### b- construction du vecteur.

La région transcarboxylase du gène de l'ACCase de *N. crassa* a été amplifiée par les amorces dégénérées #14997 (5'GTT(C)CGT(C)CTG(T,C)GGT(C)CAA(G)A(C)G3') et #94 (5'TCGTTG(A)ATG(A)GCC(T)TGG(A)GCG(A,T)GTC(G,T)TTA(G,C)AA3') déduites de la séquence de *S. cerevisiae* en tenant compte de l'usage des codons chez *N. crassa*. L'amplification avec les amorces oligonucléotidiques 14997 et 94 a permis d'obtenir un fragment de 591bp qui a été cloné dans le site *Sma*I du plasmide pUC18. Après séquençage de ce fragment, il a été cloné dans le site *Sma*I du plasmide pEmB119 (Dente *et al.*, 1983, Nucleic Acid Research, 11:1645-1655) portant comme marqueur le gène am cloné dans le site *Bam*HI. Le vecteur obtenu est nommé pNC600.

### c- transformation de *N. crassa*

*N. crassa* Am132A est cultivé sur un milieu incliné (Vogel 1X, sucrose 2%, acide glutamique 6mM, agar 15 g/l) pendant 5 jours. Les spores sont reprises dans un milieu de germination (Vogel 0,5X, sucrose 1,5%, acide glutamique 6mM). La solution de spores est filtrée sur une gaze stérile et la solution de spores est diluée avec du milieu de germination pour obtenir une concentration de spores de  $0,5 \cdot 10^8$  à  $10^9$  spores/ml. La solution de spores est mise à incuber à 30°C sous agitation pendant 4 heures. A intervalles réguliers après 3 heures, la germination des spores est vérifiée sous microscope. Lorsque 70-90% des spores ont germé, les spores sont lavées deux fois dans de l'eau stérile, puis une fois dans 10 ml de sorbitol 1M. Les spores sont alors reprises dans 50 ml de sorbitol 1M en présence de 20mg de Novozyme<sup>234</sup> et incubées à 30°C sous agitation pendant 50-70min. La compétence est alors vérifiée en ajoutant 20µl d'eau à 10µl de cellules. Il y a lyse des cellules compétentes. Les cellules sont lavées deux fois dans 10 ml de sorbitol 1M, puis 1 fois dans 10 ml de STC (1M Sorbitol, 50mM Tris-HCl pH8, 50mM CaCl<sub>2</sub>). Les cellules compétentes sont alors reprises dans 400µl de STC (par tube utilisé au départ), 5µl de DMSO, et 10µl de PTC (40% polyéthylène glycol 4000, 50mM Tris-HCl pH8, 50mM CaCl<sub>2</sub>). Les cellules compétentes sont conservées à -20°C.

Pour la transformation des cellules, 10µg de plasmide est mis en présence de 400µl de cellules compétentes et de 25µl d'héparine (5mg/ml dans STC). Le mélange est mis à incuber 30 min sur la glace. 5 ml de PTC est ajouté et l'incubation est poursuivie pendant 20 min à température ambiante. Différents volumes de cellules transformées sont mélangés à 15 ml de

- 5 Top Agar (Vogel 1X, 1M Sorbitol, 55mM Sorbose, 1,5mM Glucose, 1,5mM Fructose, 20mM Glycine, 28g/l agar) et étalés sur un milieu gélosé (Vogel 1X, 55mM Sorbose, 1,5mM Glucose, 1,5mM Fructose, 20mM Glycine, 15g/l agar). Après 2 à 3 jours de croissance à 30°C, les transformants sont transférés sur milieu sélectif incliné ( Vogel 1X, 2% Sucrose, 20mM glycine, 15g/l agar). Les transformants sont ensuite purifiés par trois passages sur
- 10 milieu sélectif contenant 1M de sorbitol qui permet l'isolement d'une colonie.

d- croisement de *N. crassa*.

- Une des souches parentes est mise à pousser en boîte de Petri sur un milieu minimum de croisement (1g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g/l KNO<sub>3</sub>, 0,5g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1g/l NaCl, 0,1g/l CaCl<sub>2</sub>, 5µg/l D-biotine, 1g/l acide glutamique, 15g/l agar et 0.1 ml/l d'une solution contenant 50g/l
- 15 d'acide citrique, 50 g/l ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10g/l Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2,5g/l CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,5g/l MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,5g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, pH6,5. La source de carbone est la cellulose apportée sous forme de papier Whatman 3MM. La souche est incubée sur ce milieu pendant 6 jours à 25°C avant de la croiser avec une solution de spores de l'autre souche parente. Les spores sont éjectées des périthèces environ 9 jours après le croisement.
- 20 Les spores sont alors récupérées sur le couvercle de la boîte de Petri et étalées sur le milieu de sélection et incubées à 25°C pendant la nuit. Les spores présentant de longs tubes germinatifs (am+) sont isolées sous microscope.

e- Résultat de la mutation du gène de l'ACCCase de *N. crassa*

- Chez *N. crassa*, la présence de séquences répétées soumet ces séquences à des
- 25 mutations préméiotiques (Repeat Induced Mutations, Selker, 1990, Annu. Rev. Genet. 24: 579-613). Les séquences répétées sont inactivés par des changements de paires de base (G-C : A-T) et par des méthylations de cytosines. Ce phénomène a été utilisé pour muter le gène codant pour l'ACCCase de *N. crassa*.

- Pour muter le gène de l'ACCCase de *N. crassa*, un vecteur comprenant une partie de la
- 30 région transcarboxylase du gène de l'ACCCase de *N. crassa* ainsi que le gène de la NADP specific glutamate dehydrogenase (gene am) comme marqueur de sélection a été construit et a été utilisé dans la transformation de la souche Am132A (délétée du gène am). 72 transformants ont été récupérés. 24 de ces transformants présentant une croissance rapide ont été purifiés par 3 isollements successifs sur milieu contenant du sorbitol. 12 de ces 24
- 35 transformants ont été utilisés dans un croisement avec la souche Am132a. Ce premier croisement a permis de vérifier la stabilité des transformants et de sélectionner la descendance ne portant qu'une seule copie du plasmide. 7 descendants nt été sélectionnés et nt été croisés avec Am132a u Am132A en fonction de leur mating type. Les descendants

de ce deuxième croisement ont été sélectionnés pour leur différence de croissance sur milieu avec ou sans palmitate. Un mutant MC2C662 a montré une nette différence de croissance en milieu avec ou sans palmitate à 25°C.

3) Complémentation fonctionnelle du mutant ACCase de *N.crassa* par l'ACCase d'Egh

- 5 Ce mutant MC2C662 est utilisé pour l'expression du gène ACCase d'Egh. Pour cela, l'insert contenu dans le clone p18.1-6 a été séparé du plasmide pUC9 par digestion avec l'enzyme de restriction *Sall* et purification par électrophorèse sur gel d'agarose. Ce fragment *Sall* de 13 kpb contient la partie codante du gène de l'ACCase d'*E.graminis* ainsi que 3,5 kpb de la région 5' amont et 3 kpb de la région 3' aval. Les extrémités de l'insert ont été rendues
- 10 franches par traitement avec l'ADN polymérase de Klenow. L'insert à bouts francs a ensuite été cloné dans le site *Bgl*II rendu franc par traitement par l'ADN polymérase de Klenow du plasmide pAN7-1 porteur du gène codant pour l'hygromycine B (Punt *et al.*, 1987, Gene, 56:117-124). Un des plasmides obtenu a été nommé pEGH94 et a été utilisé pour la transformation de la souche mutante de *N.crassa* MC2C662 décrite ci-dessus. Une des
- 15 souches transformée sélectionnée de *N.crassa* est capable de pousser sur un milieu contenant de l'hygromycine et ne contenant pas de palmitate.

Cette souche de *N.crassa* complémentée par l'ACCase d'oïdium valide la faisabilité de l'objet de l'invention et est un des éléments à la base du test de criblage qui fait l'objet de la présente invention.

20

Ces deux exemples montrent bien l'utilisation de la présente invention telle qu'elle a été décrite dans sa généralité ci-dessus, à savoir un test de criblage permettant de déterminer une activité potentielle spécifique d'une cible biochimique déterminée.

25



## SEQUENCE LISTING

## SEQ. ID. NO. 1

1	TAATGGCAGCCATCTAGCCCCATCACTACTCCAGCCCTCCACGTAAACCATGAGGCTTGT	60
61	AATGGCGTGTGCAAGAAGTGGCTACAGAGATTGGGAAGGATGCATATTGAGACAAGGGGC	120
121	TTTCAAGCGCTGTAGCATTCTAGCACTGCTCAACTTAAGCTACCTCACAGCCTTATGAGA	180
181	GATTTTGGCCCGTTTTTCCCAGCCACATGGTAAGAAGATGATGATGTCATTTACATGACT	240
241	GTAAGGAGGGGCTGTGGCGAAAGTTCACACATTGCAAGACCCCTCATTCTCGTATTGGAC	300
301	CTTGATTGTTAATTTAAGCGGGAAATCCGTGTCCTCACCCTCTTGATTTTCTGCCTCAAA	360
361	CTAAAGGCGGCTTTAACCCTGGCAAACAGGGCGGGTGCTACCGAAGTGATCCATCACGC	420
421	CGGAATGTACTTTTCATCAAGGGCTTGCGAGTCTTAGAAGTAAATTTGGGTAATTCTTGGA	480
481	ACGGATYGCGCTCAGCCTTTGCTGTGTGAGCCATTGAATTCATAGCGATTGTGCTAXGATT	540
541	GAAAATAGTTGTCACTAGCATTAGTAATCTCCCCAGGCAGTCAATGTCGTTGGCAGGCGT	600
601	TGTTGGATTGGCGGGCTACCCGATATAGTTAGATCAGCCCAACGTGTAGACCCCGTACTC	660
661	ACCAAATTTGGCCCAGATCGCCAGCCGCTGCGCTGTGTTGGGATGATTGACCAAGAGCT	720
721	AGTCAAGCTCATCGCTGCAGGCAAAAATTCATGTTTCCATGATATGCCGACAGGCCCCAA	780
781	TCTCTAACGTCCCTTCATATCTTTGAACTGTTCAACTTCAATCATTCAATACTAAAAATT	840
841	TTGCTCTTCCCACTTATTCTTCTCAAGCTCTTCAATAGTCTTACAATACATTTCAGA	900
901	CATTGTGAAAGGGCATAAATTTACTCCGAACTACACTAGGAGTTACTGTGCGAAAATTTAT	960
961	ATATTCTGTCTGTACAATATTAAGAAAGATTAGTCTACACTTCTTCTACTGTATTACTG	1020
1021	GCGACATCATCACACCAAGCTCGTCTACTGCGAGCTASAAAACACACACCATGACTGAGA M T E I	1080
1081	TTAACGGTGAAGTCAGAAGACTAAGCTGTGCTGTGCCACTTGTACGCAATCAGTCATACT N G E V R R L S C A V P L V R N Q S Y S	1140
1141	CAGCAAGGCATCAAATGCTGAGCATTTTATCGGAGGTAACAAATTGGAAAATGCCTCTC A R H Q I A E H F I G G N K L E N A S P	1200
1201	CAAGCGATGTCAAGGAGTTTGTGCAAAACATGATGGCCACACTGTTATCAGAAACGTAA S D V K E F V A K H D G H T V I T N	1260
1261	ATATCTGATTCTTCTCGTACCTACAAGACTGATTAGTCGTTTCAATTAGGTTCTGATCG V L I A	1320
1321	CAAATAACGGCATAGCTGCTGTCAAGGAAATCCGATCGGTGAGAAAGTGGGCTTATGAGA N N G I A A V K E I R S V R K W A Y E T	1380
1381	CTTTCGGAGATGAACGTGCCATTCACTTCACTGTTATGGCAACGCTGAAGATCTTCAAG F G D E R A I Q F T V M A T P E D L Q A	1440
1441	CCAACGCTGACTATATTCTGATGGCTGATCAATATGTAGAGGTTCCCGGTGGCACAAATA N A D Y I R M A D Q Y V E V P G G T N N	1500
1501	ATAATAATTGCGCAAATGTCGAGCTAATCGTAGATGTGGCTGAGCGTATGGATGTCCATG N N C A N V E L I V D V A E R M D V H A	1560
1561	CTGTCTGGGCCGGATGGTGAGTCTTCCGCTTAACGAACAATCCAAACAATGCTAATCCC	1620

V W A G W

1621	GGTAAGGGGACATGCTTCAGAAAACCCAAAGTTACCCGAATCACTTGCCGCCAGCCCCAA	1680
	G H A S E N P K L P E S L A A S P K	
1681	AAAAATCGTCTTCATTGGGGCCACCAGGTTCTGCAATGAGATCACTTGGTGATAAAATATC	1740
	K I V F I G P P G S A M R S L G D K I S	
1741	CTCAACAATTGTAGCCCAGCACGCCAAGGTGCCATGTATACCTTGGTCCGGAACAGGAGT	1800
	S T I V A Q H A K V P C I P W S G T G V	
1801	AGATCAAGTTGAGGTGAACGACGAAGGAATCGTAACTGTTGATAAGGAAGTATATATGAA	1860
	D Q V E V N D E G I V T V D K E V Y M K	
1861	AGGATGTGTGCAATCCTGGCAGGAGGGACTTGAAAAGCCCGTGAAATTGGGTTCCCGGT	1920
	G C V Q S W Q E G L E K A R E I G F P V	
1921	CATGATCAAAGCTTCCGAAGGTGGCGGTGGCAAGGTATCCGAAAAGTAGATTCTGACGA	1980
	M I K A S E G G G G K G I R K V D S D E	
1981	GGGATTTGAGGCGCTTTACAAAGCTGCTGCAAATGAAATTCCTGGATCGCCAATATTCAT	2040
	G F E A L Y K A A A N E I P G S P I F I	
2041	AATGAAGCTTGCTGGAAATGCAAGGCATTAGAGGTGCAGTTACTGGCCGATGAATATGG	2100
	M K L A G N A R H L E V Q L L A D E Y G	
2101	AAATAATATTTCACTATTCGGAAGGGACTGTTCTGTTCAACGAAGACATCAAAAAATCAT	2160
	N N I S L F G R D C S V Q R R H Q K I I	
2161	TGAGGAGGCCCTGTCACTATTGCAAAGACGTCAACTTTTCAAGATATGGAAAAAGCCGC	2220
	E E A P V T I A K T S T F Q D M E K A A	
2221	CGTACGGCTAGGGCGACTTGTAGGCTACGTTTCTGCGGGACTGTGCAATATTTGTACTC	2280
	V R L G R L V G Y V S A G T V E Y L Y S	
2281	GCATGCTGAAGATAAATCTACTTTTGGGAATTAATCCCCGGCTTCAGGTGGAACATCC	2340
	H A E D K F Y F L E L N P R L Q V E H P	
2341	AACGACAGAAATGGTCAGTGGTGTCAATTTACCCGCGGCACAGCTTCAAATTGCAATGGG	2400
	T T E M V S G V N L P A A Q L Q I A M G	
2401	ACTTCCCCTTCACAGAATACGAGACATTGCACTATTGTATGGAGTAGATCCCCAGGGATC	2460
	L P L H R I R D I R L L Y G V D P Q G S	
2461	TACAGAGATCGATTTTGATTTTTTCGAAGGATTCTTCTCTGAAACTCAGAGGAGGCCAAC	2520
	T E I D F D F S K D S S S E T Q R R P T	
2521	CCCCAAAGGCCACACAACCTGCTTGCCGAATAACCTCTGAAGACCCTGGAGAAGGGTTAA	2580
	P K G H T T A C R I T S E D P G E G F K	
2581	GCCATCAAGCGGCATGATGCATGAACTAACTTTAGAAGTAGCTCTAACGTCTGGGGTTA	2640
	P S S G M M H E L N F R S S S N V W G Y	
2641	TTTCTCTGTGGGTACAGCTGGTGGAAATTCACAGCTTTTCAGACAGTCAGTTTGGTCACAT	2700
	F S V G T A G G I H S F S D S Q F G H I	
2701	ATTCGCGTACGGTGAAAATAGATCAGCATCTCGGAAACATATGGTAGTTGCATTAAGA	2760
	F A Y G E N R S A S R K H M V V A L K E	
2761	ACTAAGCATCAGAGGAGATTTCGCGACAACGGTCGAGTATTTGATTAAACTCCTTGAAAC	2820
	L S I R G D F R T T V E Y L I K L L E T	
2821	TCCCGCCTTTGAAGATAACACCATAACAACCTGGCTGGCTAGACGAACTTATCTCAAATAA	2880
	P A F E D N T I T T G W L D E L I S N K	

2881 GCTGACTGCTGAAAGACCCGACCCTACACTAGCTGTGTTTGTGGTGCAGTTACTAAGGC 2940  
L T A E R P D P T L A V V C G A V T K A

2941 CCACATTGCGAGTGAGGCTTGACATATCTGAATACCGAACAAGCTTAGAAAAGGGACAGGT 3000  
H I A S E A C I S E Y R T S L E K G Q V

3001 TCCAGCGAAAGATATTCTTAAGACAGTATTTCTATAGATTTTCATCTATGATGGGCAGCG 3060  
P A K D I L K T V F P I D F I Y D G Q R

3061 ATACAAATTTACAGCCACCCGGTCGAGCTTAGACAGTTATCATTGTTCATCAATGGTTC 3120  
Y K F T A T R S S L D S Y H L F I N G S

3121 CAAATGCTCTGTTGGTGTTCGAGCCTTAAGCGACGGAGGACTCTTGGTTCTCCTCAGTGG 3180  
K C S V G V R A L S D G G L L V L L S G

3181 TCGGAGTCACAATGTCTACTGGAAAGAAGAAGTTGGAGCTACCAGATTGAGCGTCGATAG 3240  
R S H N V Y W K E V G A T R L S V D S

3241 TAAACATGCTTATTAGAGCAAGAGAATGACCCTTCTCAGCTTAGAACCCCATCACCTGG 3300  
K T C L L E Q E N D P S Q L R T P S P G

3301 AAAATTAGTCAAGTACACTGTTGAAAACGGAGAGCACGTCAAGACGGGGCAACCATTTGC 3360  
K L V K Y T V E N G E H V K T G Q P F A

3361 TGAAGTAGAGGTGATGAAGATGTACATGCCGCTACTCGCAGCTGAGGACGGTATTGTACA 3420  
E V E V M K M Y M P L L A A E D G I V Q

3421 ACTTATAAAACAACCTGGGGCAACTCTTGAAGCAGGAGATATTTTGGGAATACTTGCTCT 3480  
L I K Q P G A T L E A G D I L G I L A L

3481 AGACGACCCTTCGAGAGTAAACAAGCGCAACCTTTCTTAGGACAACCTACCTGACTTGGG 3540  
D D P S R V K Q A Q P F L G Q L P D L G

3541 ACCTCCTCAGGTTGTTGGAACGAAGCCGGCTCAAAGATTCTGCTTACTGCACAATGTGCT 3600  
P P Q V V G T K P A Q R F V L L H N V L

3601 ACTCAACATTTTAGACGGTTTCGACAATCAAGTTATCATGGCAGCTTCTTTGAGAGAACT 3660  
L N I L D G F D N Q V I M A A S L R E L

3661 TATCGATGTCCTCCGCGATCCAGAGCTTCCCTACGGCGAATGGAACGCCAGTTTTCGGC 3720  
I D V L R D P E L P Y G E W N A Q F S A

3721 TCTCAGCTCGAGAATGCCACCTCGCCTTGCCACGACTTTTGCTCAAGTAATGGACCGTTC 3780  
L S S R M P P R L A T T F A Q V M D R S

3781 AAGACAAAGAAAAGCCGATTTCCAGCACGAAATCTGTCAAAGCTCTGAATAAATTTCT 3840  
R Q R K A D F P A R N L S K A L N K F L

3841 TGACGAAAGCGTTGATCCAGCTGATATAGACGCGCTCAAAGCCAGTTATCCCCCTTGAA 3900  
D E S V D P A D I D A L K A T L S P L N

3901 TGACGTAATGGAGAGATACGCTGAAAGTCAGAAAGCTCATGAATTTAACGTATTTGCTGA 3960  
D V M E R Y A E S Q K A H E F N V F A D

3961 CCTCCTAGAGCGGTATGCAGCAGTAGAAAGATTGTTTTCCAATCGAACATCTCGTGACGA 4020  
L L E R Y A A V E R L F S N R T S R D E

4021 GGAAGTTATACTAAACTAAGAGATGAAAATAAGGACGATATTTCAAAGTAATTCAGAC 4080  
E V I L K L R D E N K D D I S K V I Q T

4081 CGTTCTTTCTCATAGTAGAATCGGAGCTAAGAATAACTTGATTCTAGCCATACTAGATGA 4140  
V L S H S R I G A K N N L I L A I L D E

4141 GTATAAACCCAACAAGCCTCATGCCGGTAATGTTGCACAGTTCTTTAGGCCGGCTCTTCG 4200  
Y K P N K P H A G N V A Q F F R P A L R

4201 AAAGTTGACTGAACTTGAATCACGACAAACAGCAAAAGTTTCCCTCAAAGCCCGTGAAC 4260  
K L T E L E S R Q T A K V S L K A R E L

4261 GCTCATTCAATGTGCTATGCCTTCATTAGAAGAGCGAGCAGCTCAGATGGAACATATCCT 4320  
L I Q C A M P S L E E R A A Q M E H I L

4321 ACGATCATCAGTTGTTGAGTCAAGGTACGGTGAAACAGGATGGGAACACCGCGAACCTGA 4380  
R S S V V E S R Y G E T G W E H R E P D

4381 CATTGAAGTGCTCAAAGAAGTCGTCGATTCTAAATATACGGTCTTTGATGTGCTACCGCT 4440  
I E V L K E V V D S K Y T V F D V L P L

4441 TTTCTTCGGCCATCAAGATCCATGGGTCTCGCTTGCTGCTCTTGAAGTTTACATCAGGCG 4500  
F F G H Q D P W V S L A A L E V Y I R R

4501 TGCATATCGTGCCTACTCTTTAAAAAGGTTGAGTACCACAACGATAGTTCTGATTCCCC 4560  
A Y R A Y S L K K V E Y H N D S S D S P

4561 TTTCAATTGTCTCTTGGGACTTTGTACTTCGAAACGTTGGCACGTCTGAATTCGGACTACC 4620  
F I V S W D F V L R N V G T S E F G L P

4621 AGCCCAAGTCAGGCGCAGTTACACCTGCCTCTTCAGATTTCAAAGTAATTTTCAACGCGT 4680  
A Q S G A V T P A S S D F K S N F Q R V

4681 CGCCTCCATCAGCGACATGTCATATCTTGTGAATCGCGAGAGCCACGAACCTATTAGAAA 4740  
A S I S D M S Y L V N R E S H E P I R K

4741 GGGGGTCATAGTACCCGTCCTTATCTCGATGAAGCCGAAGAATACTTGGTCCGAGCCCT 4800  
G V I V P V P Y L D E A E E Y L V R A L

4801 CGAGTTTCTTCTACATCTTCAGGTAGGAAGAAGTACCCTAACGGACTGATGCCAGATCT 4860  
E F L P T S S G R K K Y P N G L M P D L

4861 GGCAGGGAAACGGAAGACGGTGTCTTCTTCTAATGCTGAAGACGAATTAACAGCTGTAGT 4920  
A G K R K T V S S S N A E D E L T A V V

4921 GAATGTTGCAGTTCGTGACTCCGAAAGCCATGATGATAATGAAACAGTTGCTAGGATCAA 4980  
N V A V R D S E S H D D N E T V A R I N

4981 TGCAATCGTAAAGAGATCAAATCAGAACTATTGTCTCGCCGCGTCCGTCGCCTAACGTT 5040  
A I V K E I K S E L L S R R V R R L T F

5041 CATCTGTGGTCACAAAGATGGATCTTACCCAGGATACTACACTTTCCGTGGCCCCAAATA 5100  
I C G H K D G S Y P G Y Y T F R G P K Y

5101 CGAAGAGGACCAAAGTATTTCGTACAGTGAACAGCTCTAGCCTTTCAACTTGAACCTCGA 5160  
E E D Q S I R H S E P A L A F Q L E L E

5161 AAGGTTGTCCAAATTCAGGATCCGGCCTGTATTTACCGAAAAATCGGAATATTATATCTA 5220  
R L S K F R I R P V F T E N R N I H I Y

5221 CGAGGCAATCGGGAACAATGTTGAGGGCGACAAACGGTATTTACACGTGACGTTGTTG 5280  
E A I G N N V E G D K R Y F T R A V V R

5281 CCCAGGAAGACTAAGAGATGAAATTCAACTGCCGAGTACCTTATCTCTGAGTCTGATAG 5340  
P G R L R D E I P T A E Y L I S E S D R

5341 ACTGATGAATGATATTCTCGATGCCTTGGAGATAATTGGAATAACAATTCTGACCTAAA 5400  
L M N D I L D A L E I I G N N N S D L N

5401 TCACATCTTCATAAACTTTTCGCTGTCTTTCCCTGCAGCCACCAGAAGTAGAGGAAGC 5460

H I F I N F S P V F P L Q P P E V E E A  
 5461 TCTCGGTGGATTTTGTAGAGCGTTTTGGACGACGCTTTTGGAGATTGCGTGTTACTGGCGC 5520  
 L G G F L E R F G R R L W R L R V T G A  
 5521 TGAGATACGCATCATTTGTACTGATCCTATCACTAGCATGCCTTATCCTCTCCGTGTTGT 5580  
 E I R I I C T D P I T S M P Y P L R V V  
 5581 CATCACAAACACCTCTGGATACGTGATCCAAGTGGAGATGTACGCCGAAAGAAAATCCGA 5640  
 I T N T S G Y V I Q V E M Y A E R K S E  
 5641 AAAGGGTGGCGAATGGGTCTTCCACAGTATCGGAGGTACGACTCCTATCGGATCCATGCA 5700  
 K G G E W V F H S I G G T T P I G S M H  
 5701 CTTGAGATCTGTTTCAACTCCATATCCACCAAGGAGTGGCTTCAACCTAAAAGGTATAA 5760  
 L R S V S T P Y P T K E W L Q P K R Y K  
 5761 GGCCCACTTGATGGGCACGCAGTATGTCTATGACTTCCCAGAATTGTTTAGACAATCCAT 5820  
 A H L M G T Q Y V Y D F P E L F R Q S I  
 5821 TCAAAATAGTTGGTCCAAAGCTGCTCGCAAGCATCCTTCACTACTCGAAAAGCAGCCAGC 5880  
 Q N S W S K A A R K H P S L L E K Q P A  
 5881 CACCGGGGAGTGCATTGACTTCAGTGAGCTTGTGTTTGGACGACACCGACAATCTTGCTGA 5940  
 T G E C I D F S E L V L D D T D N L A E  
 5941 AGTTAATCGTGAGCCAGGAACCTAACAGTCACGGAATGGTTGGATGGATTATTACAGCAAG 6000  
 V N R E P G T N S H G M V G W I I T A R  
 6001 AACCCCAAGTATCCCAAGAGGTCCAAAGTTTGTGCTGGTCCGCAATGACATCACATTTAA 6060  
 T P E Y P R G R K F V V V A N D I T F K  
 6061 AATTGGCAGTTTGGCCCGAAAGAAGACCAATTTTCCACAAATGTACGGAACCTGCAAG 6120  
 I G S F G P K E D Q F F H K C T E L A R  
 6121 GAAATTGGGCATACCGCGGGTCTATTTATCTGCTAATTCTGGAGCTCGAATTGGTATGGC 6180  
 K L G I P R V Y L S A N S G A R I G M A  
 6181 AGAAGAGCTGATACCTCATTTCAATGTGCTTGAACGACCCAGAAAAACCGGAGGCTGG 6240  
 E E L I P H F N V A W N D P E K P E A G  
 6241 TTTCAAGTATCTATACCTCAATCGAGATGCCAAAAACGCTTCAAGACGGAAGACAAA 6300  
 F K Y L Y L N R D A K K R F E D G K T K  
 6301 AGAGGTTATCACAGAAGAGATTGTTGAGGACGGAGAACTCGTTACCGTATAACCACAAT 6360  
 E V I T E E I V E D G E T R Y R I T T I  
 6361 AGTTGGTGCTGAAGACGGTCTTGGTGTGCAATGTCTAAAGGGCTCAGGTTTAATTGCAGG 6420  
 V G A E D G L G V E C L K G S G L I A G  
 6421 GGCTACAAGTCGTGCATATGAGGACATCTTCACAATTACCCTTGTGACATGTAGGTCCGT 6480  
 A T S R A Y E D I F T I T L V T C R S V  
 6481 TGGAATCGGGGCTTATCTTGTTCGTCTTGGACAACGAGCTATCCAAATAGAAGGGCAGCC 6540  
 G I G A Y L V R L G Q R A I Q I E G Q P  
 6541 TATTATTCTTACTGGTGCCCTGCAATTAACAACTTCTTGGCCGCGAAGTATATACTTC 6600  
 I I L T G A P A I N K L L G R E V Y T S  
 6601 AAAGTTGCAACTTGGTGGAAACCCAAATTATGTATCGCAATGGAGTCTCTCACATGACGGC 6660  
 N L Q L G G T Q I M Y R N G V S H M T A  
 6661 AACTGATGATTTTGGAGGTGTTTCCAAAATTCTCGAGTGGATGTCATACGTACCCGACAA 6720  
 T D D F E G V S K I L E W M S Y V P D K

6721	AAGGAACAATCCATTACCAATTGGACCGGCAAGTGATTTCGTGGGATCGGGAAGTGAGTTA	6780
	R N N P L P I G P A S D S W D R E V S Y	
6781	CTCACCACCACCTAAGCAGCCATATGATGTTAGATGGCTTATCGCTGGCAAGGACGACGA	6840
	S P P P K Q P Y D V R W L I A G K D D E	
6841	AGAAGGGTTTTTACCTGGTCTATTTGATAAGGACTCTTTCGTGCGAAACTCTTGGTGGCTG	6900
	E G F L P G L F D K D S F V E T L G G W	
6901	GGCCAAGACTGTTGTTGTCGGTCGTGCAAGACTTGGTGGTATTCCAATGGGTGTAATTGG	6960
	A K T V V V G R A R L G G I P M G V I G	
6961	TGTTGAAACCCGTTCAAGTCGAAAATATTACACCCGAGACCCTGCAAACCTGATTCTAC	7020
	V E T R S V E N I T P A D P A N P D S T	
7021	AGAGCAAATTACCAATGAAGCAGGCGGAGTATGGTATCCAACTCTGCTTTTAAGACTGC	7080
	E Q I T N E A G G V W Y P N S A F K T A	
7081	TCAAGCAATCAAGGACTTCAATAATGGCGAACAGTTGCCGTTGATGATACTTGCTAATTG	7140
	Q A I K D F N N G E Q L P L M I L A N W	
7141	GAGAGGTTTCTCTGGAGGTGAGCGGGATATGTACAATGAGGTATTGAAATATGGCTCATA	7200
	R G F S G G Q R D M Y N E V L K Y G S Y	
7201	CATTGTCGATGCCCTGGTCAAGTACGAGCAACCAATTTTGTATATATACCTCCATTGG	7260
	I V D A L V K Y E Q P I F V Y I P P F G	
7261	AGAGCTACGCGGAGGCTCTTGGGTAAGTTATCAACTTTGGACTACTAAAATTATTTCTAA	7320
	E L R G G S W	
7321	CGATTGCAGGTTGTCGTTGACCTACCATTAAATCCCGATTTTATGGAGATGTATGCTGAT	7380
	V V V D P T I N P D F M E M Y A D	
7381	ATCGACTCTCGCGGTGGCGTCCTTGAGCCTGAAGGTATAGTAAACATCAAATACCGTCGT	7440
	I D S R G G V L E P E G I V N I K Y R R	
7441	GATAAGCAACTCGAGACTATGGCACGTCTGGACCCTGAGTACGGTGCTCTTCGAAAGCAG	7500
	D K Q L E T M A R L D P E Y G A L R K Q	
7501	CTCACAGATCCGTCACTCACTCCAGATCAATTAAGTGATATTAAAGTCAAAGCAAGTGCA	7560
	L T D P S L T P D Q L S D I K V K A S A	
7561	CGTGAACAATTACTTTTACCTGTGTACATGCAGGTTTCATTACAGTTTGCCGATTTACAC	7620
	R E Q L L L P V Y M Q V S L Q F A D L H	
7621	GATCGAGCTGGGCGTATGAAAGCAAAAGATGTAATACGTCAGTCATTAGTCTGGAGAGAA	7680
	D R A G R M K A K D V I R Q S L V W R E	
7681	GCTCGCCGCTTCTTCTACTGGCGGGTACGTCGTCGTGTTAACGAAGAGTATATTCTAAAG	7740
	A R R F F Y W R V R R R V N E E Y I L K	
7741	CGTATGTCAACGGCGTCTAAGAATTCTCTGAAATCCCGAGCTCGAAACATTGCAACTTTA	7800
	R M S T A S K N S L K S R A R N I A T L	
7801	TCTGCATGGACTGGCATTTCATTGTTTCGAAACGGCTGACCGTGAGGTGCGCAATGTGGTAC	7860
	S A W T G I S L F E T A D R E V A M W Y	
7861	GAAGAAAATCGTAAAGTTGTCGGTGAGAAGGTCGAGTCTCTCAAACTGATGACGTAGCA	7920
	E E N R K V V G E K V E S L K T D D V A	
7921	TTGAGGTTCTCAGCCTTGCTGCGATCTAATGGAAAGGGTGGACTTAAAGGTGTACACCAG	7980
	F E V S A L L R S N G K G G L K G V H Q	

7981 GTGCTGAGTATGTTGCCTGCAAATGAGAGGGAAGAGGCCTTAAGATACTTGAGTGAGACG 8040  
V L S M L P A N E R E E A L R Y L S E T  
8041 TAAACAGATTGAAATATTTTGAAGTCTTACTTTTCCCTAGTCACITTCATAGGGACGAG 8100  
\*  
8101 AGGATAATATTTGTATATATATA 8123

Revendications

5

1. Microorganisme, caractérisé en ce qu'il ne présente plus, par mutation, d'activité homologue de l'activité d'une cible biochimique déterminée et qu'il est complétement par expression de l'activité cible ou d'une activité homologue.

10

2. Microorganisme selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est de type eukaryote.

3. Microorganisme selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par une levure .

15

4. Microorganisme selon la revendication 3, caractérisé en ce que la levure est du type *Saccharomyces*.

20

5. Microorganisme selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un champignon .

6. Microorganisme selon la revendication 5, caractérisé en ce que le champignon est du type *Neurospora*.

25

7. Microorganisme selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la cible biochimique est l'acétylcoenzymeAcarboxylase: ACoACase, EC 6.4.1.2.

8. Microorganisme selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'ACoACase provient du rat: *Ratus norvegicus*.

30

9. Microorganisme selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'ACoACase provient de *Erysiphe graminis* SEQ ID NO: 1 .

35

10- Système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée, comprenant au moins deux microorganismes, selon l'une des revendications 1 à 9, identiques du point de vue génétique à l'exception de l'activité cible ou d'un homologue de cette activité:



- le premier pour tester l'expression de l'activité cible capable de compléter un microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance,
  - le second pour tester l'expression d'une activité homologue à l'activité cible provenant d'un organisme quelconque et capable de compléter le même microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance.
- 5

10 11- Système de criblage selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend deux microorganismes distincts.

12- Système de criblage selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend trois microorganismes distincts.

15 13- Système de criblage selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que la cible biochimique est choisie de sorte que l'inhibition de l'activité de la cible biochimique soit létale pour la croissance du microorganisme complétement, au moins dans un milieu de culture déterminé.

20 14-. Procédé de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée, caractérisé en ce qu'on applique le produit à tester sur chacun des microorganismes du système selon l'une des revendications 10 à 13 et qu'on effectue l'observation de l'inhibition différentielle, par le produit testé, de la cible et d'un de ses homologues.

25 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'on sélectionne des molécules ayant une action protectrice des plantes.

16-. Séquence du gène codant pour l'ACoACase d'*Erysiphe graminis* selon SEQ ID NO:1.

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2727129

N° d'enregistrement  
nationalFA 506994  
FR 9414187

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande enregistrée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	J BIOL CHEM 268 (15). 1993. 10946-10952, HASSLACHER, M. ET AL. 'ACETYL - COA CARBOXYLASE FROM YEAST IS AN ESSENTIAL ENZYME AND IS REGULATED BY FACTORS THAT CONTROL PHOSPHOLIPID METABOLISM.' * page 10949, colonne de gauche, ligne 11 - colonne de droite, ligne 16 *	1-4,7
A	EP-A-0 608 722 (AMERICAN CYANAMID CO) 3 Août 1994 * page 2, ligne 18 - ligne 46 * * page 4, ligne 22 - ligne 26 *	10-14
X	GLOVER, D. (ed.) 'DNA cloning volume III: a practical approach'; 1987, IRL Press Ltd. Oxford, GB pages 141-161; CARTER, B. et al.: 'Expression and secretion of foreign genes in yeast' * page 144, ligne 5 - page 146, ligne 14 * * figure 2 * * page 148, ligne 4 - page 149 *	1-4
X	WO-A-91 13971 (HAWAII BIOTECHNOLOGY GROUP INC) 19 Septembre 1991 * page 2, ligne 18 - ligne 25 * * page 5, ligne 15 - ligne 22 *	1,5,6
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, no. 5, 1 Mars 1991 pages 1731-1735, XP 000178717 ELLEDGE, S. ET AL. 'lambdaYES: A MULTIFUNCTIONAL cDNA EXPRESSION VECTOR FOR THE ISOLATION OF GENES BY COMPLEMENTATION OF YEAST AND ESCHERICHIA COLI MUTATIONS' * le document en entier *	1-4
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
22 Août 1995		Andres, S
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**Microorganism with specific biochemical activity deleted by mutation**

Patent Number: FR2727129  
Publication date: 1996-05-24  
Inventor(s): LEBRUN MICHEL;; GROSJEAN COURNOYER MARIE CLAIR;; HOLLOMON DEREK W  
Applicant(s): RHONE-POULENC AGROCHIMIE (FR)  
Requested Patent: ☐ FR2727129  
Application Number: FR19940014187 19941121  
Priority Number(s): FR19940014187 19941121  
IPC Classification: C12N1/16; C12N1/14; C12N15/52; C12Q1/02  
EC Classification: C12N9/00L, C12Q1/18  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

Microorganism (A) mutated so that it does not have activity homologous to a target activity but is complemented by expression of the target (or homologous) activity is new. Also new is a system for screening to detect cpds. with specific activity against a partic. biochemical target comprising at least 2 microorganisms genetically identical except for target or homologous activity. The gene for ACoACase (acetyl coenzyme A carboxylase) of *Erysiphe graminis*, having the sequence of 8123 bp given in the specification is claimed.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2